

Institut d'Hygiène de l'Université de Zurich

Directeur: Professeur H. Mooser

Etude de la sensibilité à un bactériophage de Proteus X 19

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Zurich
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

EUMORPHIA COURCOUTA

de

Tessaloniki (Grèce)

Acceptée sur le préavis du Professeur H. Mooser

Zurich 1953

City-Druck AG, Zürich

Institut d'Hygiène de l'Université de Zurich

Directeur: Professeur H. Mooser

Etude de la sensibilité à un bactériophage de *Proteus* X 19

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Zurich
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

EUMORPHIA COURCOUTA

de

Tessaloniki (Grèce)

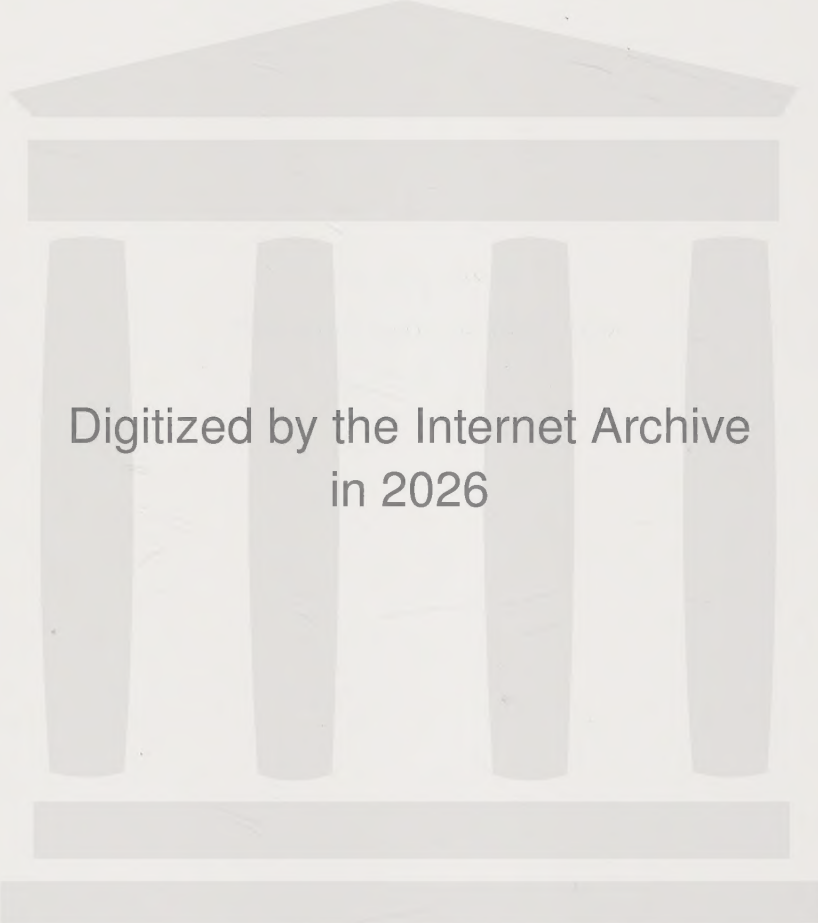
Acceptée sur le préavis du Professeur H. Mooser

Zurich 1953

City-Druck AG, Zürich



*A mes parents
avec toute ma reconnaissance*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507224_0051

Introduction

En 1916, *Weil* et *Felix*¹ démontraient que certaines souches de *Proteus*, qu'ils nommèrent «X», étaient agglutinées par le sérum des malades atteints de typhus exanthématique.

Depuis cette époque, la relation entre *Proteus* X et *Rickettsia prowazeki*, agent étiologique du typhus exanthématique (Rocha-Lima²), n'a cessé d'occuper les chercheurs. De l'hypothèse de *Fejgin*³, selon laquelle les *Rickettsies* constitueraient la forme submicrobienne d'une espèce dont *Proteus* X 19 constituerait la forme microbienne, jusqu'aux travaux de *Castaneda*^{4, 5, 6} qui a déterminé chimiquement le facteur antigénique commun, responsable de la réaction de Weil-Felix, de nombreux auteurs, parmi lesquels *Hammarström* et al.⁷, *Giroud* et *Jude*⁸, *Krestovnikova*⁹, *Westphal* et al.¹⁰, *Ciuca* et al.^{11, 12}, ont abordé le problème sous différents aspects. Nous n'entrerons pas dans les détails des explications et conclusions proposées. Quoiqu'il en soit, il y a toujours de l'intérêt théorique à rechercher les *Proteus* X dans un milieu libre de typhus.

Ainsi, *Kauffmann* et *Perch*^{13, 14} ont recherché au Danemark en 1947 et 1948 les *Proteus* X et en ont trouvés un certain nombre qui représente le 6 % des 538 souches examinées. Ils conclurent que *Proteus* X est relativement fréquent dans leur pays. Ces deux auteurs, effectuant l'analyse antigénique de leurs 26 souches de *Proteus* X ont pu les répartir dans 3 groupes principaux, se distinguant par des antigènes 0 différents et dont les représentants sont respectivement X 19, X 2 et XK (tableau I).

Tableau I

Classification des *Proteus* X selon Kauffmann et Perch

Groupe	Souches	Antigènes	
		0	H
1	X 19, KP 21	1a	1a, 1b, 1c
	XL, 302, 303	1a, 1b	1a, 1b, 1d
	85, 100, 101, 133	1a, 1b	1a, 1b, 1d
2	X2, 258, 392	2a	1a, 1b, 1c
	XK etc.	3a	1a, 1c, 1e
3	403 etc.	3a	2a, 2b
	248, 252	3a	2a, 2c

Le but initial du présent travail a été de rechercher à Zurich les *Proteus* X afin d'étudier les possibilités de compléter la classification sérologique par une investigation du comportement des souches X vis-à-vis d'un phage spécifique. La valeur de cette méthode a été en particulier démontrée par *Craigie* et *Yen*¹⁵ pour les souches Vi de *Salmonella typhi*

que la lysotypie permet de différencier malgré leur identité sérologique.

Dans un travail préliminaire, nous avons isolé 134 souches de *Proteus* à partir des selles et urines de 566 personnes (79 dans les selles, 55 dans les urines), soit un pourcentage de 21,9 % de *Proteus*. Aucune de ces 134 souches n'a été agglutinée par le sérum anti-OX 19; ce qui tend à montrer que si la présence des *Proteus* X à Zurich n'est pas impossible, elle semble plus rare qu'au Danemark.

Si l'on admet que nos 134 souches forment un échantillon représentatif («random sample») de la population de *Proteus* à Zurich, nous pouvons indiquer les limites fiduciaires à l'intérieur desquelles le vrai pourcentage de *Proteus* X doit se trouver; en effet, ayant constaté 0 souches X parmi 134 examinées, les limites pour une probabilité fiduciaire de 95 % se situent à 0 % et à 3 %. On peut donc dire qu'à Zurich les souches X représentent moins de 3 % de la population totale de *Proteus* ¹⁶.

N'ayant pas trouvé dans notre matériel de souches X, nous avons effectué notre étude sur les souches X du premier groupe de la classification de *Kauffmann* et *Perch* mises à notre disposition par le professeur *Kauffmann* de Copenhague.

Matériel et méthodes

Souches de Proteus X:

Nous avons reçu de *Kauffmann* les souches suivantes: X 19, KP 21, XL, F 302, F 303, F 85, F 100, F 101, F 133. En outre, nous avons utilisé une souche OX 19 de l'Institut d'Hygiène de Zurich.

Séra:

Le sérum de lapin anti-OX 19 a été préparé selon la méthode décrite par *Marti* ¹⁷. Ce sérum agglutine les souches privées de leur antigène H (ébullition pendant 60') jusqu'à un titre de 1:640 en tubes.

Pour avoir une analogie avec la réaction de Weil-Felix, on a infecté des lapins avec *Rickettsia mooseri*, ce qui a permis au bout de dix jours d'obtenir un sérum donnant une agglutination spécifique à un titre de 1:320. Les contrôles des séra concentrés avant l'infection des lapins étaient négatifs.

Toutes les souches citées étaient agglutinables par les deux séra aux titres indiqués.

Bactériophage:

1. Le bactériophage dont nous nous sommes servi a été isolé par *H. Mooser* en 1939. Ce phage réactivé par passage sur *Proteus* X 19 atteignait le titre de 10^8 à 10^9 particules/cc. Nous avons utilisé soit la suspension concentrée, soit une suspension diluée contenant entre 10 et 100 phages/cc.

2. La sensibilité des différentes souches vis-à-vis du bactériophage a été testée selon deux méthodes.

a) Méthode en tubes: 8 cc de bouillon étaient encencés avec une goutte d'une culture de 12 heures et incubés à 37°. Après deux heures, les cultures légèrement troubles étaient additionnées d'une goutte de la suspension contenant 10^8 bactériophages/cc. On observe dans les souches sensibles au bout d'une heure un éclaircissement de la culture. Des cultures sans phage ont toujours servi de contrôles.

b) Méthode sur milieux solides: 0,5 cc d'une culture en bouillon de deux heures sont additionnés d'un cc d'une suspension contenant une cinquantaine de phages/cc. 5 cc de gélose à 0,7 % liquéfiée sont ajoutés au mélange et le tout est versé sur des plaques de gélose à 1,5 % (méthode de la double couche de *Gratia*¹⁸). Après deux heures d'incubation à 37°, les taches vierges apparaissent et sont assez nettes pour que l'on puisse les compter aisément. Toutes les souches sensibles ont toujours donné le même nombre de taches vierges.

3. L'adsorption du bactériophage a été étudiée soit sur les souches sensibles tuées par la chaleur, soit sur les souches résistantes vivantes ou tuées.

Une culture de deux heures (éventuellement chauffée pendant 3' à 100°) est mise en contact avec une quantité convenable de phage pendant 20' à 37°, puis centrifugée. Le contenu en phage d'un cc de surnageant est titré d'après la méthode mentionnée, en se servant d'une souche sensible comme indicateur (méthode sur milieux solides).

Mutants:

Pour isoler les mutants résistants au bactériophage, une culture de 3 heures en bouillon, additionnée d'une goutte de suspension de bactériophages contenant 10^8 particules/cc est incubée jusqu'à éclaircissement complet. 0,1 cc sont alors étalés sur plaque de gélose. Les colonies qui se développent sont formées de bactéries résistantes. Après quelques repiquages, la résistance de ces germes a été de nouveau contrôlée. On a recherché la présence ou l'absence de l'antigène X en contrôlant l'agglutination sur lame de ces mutants par le sérum anti-Rickettsies dilué au $1/_{20}^e$.

Résultats

Les souches X du premier groupe de la classification de Kauffmann, à une exception près, ainsi que la souche 0X 19 de Zurich sont sensibles à notre bactériophage. La souche KP 21, étroitement associée à 0X 19, s'est révélée résistante. Ce comportement particulier de KP 21 démontre à lui seul que le phage est capable d'une spécificité supérieure à celle que les méthodes sérologiques permettent de déceler.

La première explication possible de la résistance de KP 21 est celle de la lysogénie de cette souche par rapport au phage étudié. Afin de vérifier cette hypothèse, on a cultivé KP 21 en présence de la souche 0X 19. Après 6 heures d'incubation, la culture mixte a été filtrée sur Seitz et on a recherché le bactériophage dans le filtrat selon les méthodes déjà décrites. En effet, si l'on admet que KP 21 libère spontanément des particules de bactériophage, celles-ci auraient l'occasion de se multiplier sur la souche sensible 0X 19 et devraient être retrouvées en grand nombre dans le filtrat. D'après cette méthode, il ne semble pas que KP 21 soit lysogène.

La deuxième hypothèse expliquant la résistance de KP 21 serait celle de l'absence du récepteur spécifique responsable de l'adsorption du bactériophage. Afin d'éclaircir ce problème, nous avons mis en contact le bactériophage pendant 20' à 37° avec une culture en bouillon de KP 21 âgée de deux heures, puis nous avons centrifugé. Le surnageant ne contenait pas de phage, tandis que la même épreuve, pratiquée sur une souche de *Proteus vulgaris*, a permis de mettre en évidence dans le surnageant le nombre prévu de phages. Cette inactivation du phage pourrait être due soit à une adsorption spécifique, soit à une neutralisation par un antiphage soluble. Pour exclure cette dernière possibilité, l'expérience précédente a été refaite avec: a) un filtrat de KP 21 au lieu de la culture même, b) des germes plusieurs fois lavés à l'eau physiologique. Dans le premier cas, le phage n'a pas été neutralisé; dans le second cas, le phage a été adsorbé. KP 21 est donc probablement porteur du récepteur spécifique. Ce récepteur n'est pas détruit par la chaleur (3' à 100°), ce qui est également le cas pour le récepteur des souches sensibles. En effet, ces souches, chauffées à 100° pendant 3' adsorbent le phage au même taux que KP 21. Le tableau II résume nos observations.

Tableau II

Adsorption du phage sur certaines souches de *Proteus*

Souches		taches vierges après 20' de contact	
Résistantes	KP 21 (vivante)	0	
	KP 21 (tuée à la chaleur)	0	
	KP 21 (lavée)	0	
Sensibles	X 19, XL, F 85	} tuées à la chaleur	0
	F 100, F 101, F 133		
	F 302, F 303		
Contrôles	Filtrat de KP 21	env. 200	
	Proteus vulgaris (vivante)	env. 200	
	Bouillon stérile	env. 200	

Le fait que KP 21 soit porteur de l'antigène X et du récepteur spécifique d'une part, le fait que les souches de *Proteus vulgaris* que nous avons étudiées n'adsorbent pas notre phage d'autre part, nous a conduit à penser que l'antigène X et le récepteur spécifique du phage étaient identiques.

Selon *Marti*¹⁷, la souche 0X 2, mise en présence d'un bactériophage, donne naissance à des mutants résistants de deux sortes, les uns ayant conservé l'antigène X (c'est-à-dire restant agglutinables par le sérum anti-Rickettsies), les autres l'ayant perdu. Si notre hypothèse est juste, seuls les mutants X-positifs de 0X 19 devraient adsorber le phage.

Nous avons donc étudié pour chaque souche 20 mutants résistants au phage. Chacun de ces mutants a été agglutiné sur lame avec le sérum anti-Rickettsies et avec le sérum anti 0X 19. Les deux résultats concordants permettent de distinguer pour chaque souche deux groupes de mutants, les uns X-positifs, les autres X-négatifs (tableau III).

Tableau III

Classification basée sur l'antigène X des mutants
résistants au bactériophage

Souches	Nombre de mutants	
	X — pos.	X — neg.
X 19	12	8
OX 19 Zch.	11	9
XL	10	10
F 85	4	16
F 100	5	15
F 101	12	8
F 133	1	19
F 302	6	14
F 303	1	19

Toutes les souches donnent naissance à des mutants tant X-positifs qu'à des mutants X-négatifs; ceci dans un pourcentage variable. Il est toutefois impossible d'accorder une importance spéciale à ces différences relatives, étant donnée l'ignorance où nous sommes de l'instant chronologique auquel la mutation se produit.

Nous avons éprouvé la capacité d'adsorber le phage des deux types de mutants de chaque souche. Les résultats ont été très nets: aussi bien les mutants X-positifs que les mutants X-négatifs se laissent subdiviser en deux classes dont l'une adsorbe le phage et l'autre ne l'adsorbe pas. L'hypothèse selon laquelle l'antigène X serait le récepteur du phage se voit ainsi rejetée. La classification en mutants X-positifs et X-négatifs est indépendante de la faculté d'adsorption du phage (tableau IV).

Tableau IV

Répartition des mutants résistants selon leur capacité d'adsorber le phage et la présence de l'antigène X

	X pos.	X neg.
adsorbant	7	9
non adsorbant	15	26

Ces expériences ont été effectuées selon la technique décrite avec des souches chauffées pendant 3 minutes à 100°, ce qui a permis d'éviter les difficultés liées à la présence de mutants lysogènes. En effet, au cours des mêmes expériences pratiquées avec des souches vivantes, nous avons trouvé que toutes les souches donnaient issue à un certain nombre de mutants lysogènes.

Observations annexes sur les mutants lysogènes:

Le phage ajouté à une suspension de cellules vivantes de certains mutants résistants semblait s'y multiplier. Pensant d'abord à une mutation rétrograde vers la sensibilité, nous avons recherché le temps de latence de la multiplication du bactériophage sur ces mutants, qui aurait dû être de 16'; valeur du temps de latence observé sur la souche sensible XL (tableau V).

Tableau V

Temps de latence du bactériophage sur XL

Temps	Nombre de taches vierges
0'	23
10'	26
15'	24
16'	20
17'	286
18'	260
20'	268

(A 49 cc d'une culture en bouillon de deux heures de *Proteus* XL, on a ajouté 1 cc d'un filtrat contenant environ 1250 particules de phages/cc; ce qui donne un titre final de 25 phages/cc. Aux différents temps indiqués, on a prélevé 1 cc du mélange, qui, additionné de 5 cc de gélose semi-solide liquéfiée, a été coulé sur plaque de gélose selon la méthode de la double couche de Gratia. Le nombre des taches vierges, visibles après deux heures d'incubation, est indiqué dans le tableau ci-dessus.)

Contrairement à l'hypothèse d'une mutation rétrograde, l'apparition d'un grand nombre de phages avec le mutant examiné s'effectue sans temps de latence (tableau VI).

Tableau VI

Apparition de bactériophages dans une souche lysogène stockée

Temps	Nombre de taches vierges
0'	627
5'	605
10'	634
12'	658
15'	642
20'	620

(Nombre de particules de phages ajouté = 40)

Nous nous sommes alors demandé si le phage exogène jouait un rôle dans la libération de ce grand nombre de phages, ou si nous avons simplement mis en évidence des phages libérés spontanément par une souche lysogène.

Afin d'éliminer les phages libres éventuels, nous avons lavé les bactéries à plusieurs reprises dans de l'eau physiologique, puis nous les avons resuspendues en bouillon; nous avons ensuite effectué le titrage des phages libres dans le surnageant, d'une part sans adjonction de phages extérieurs, d'autre part après en avoir ajoutés (40 particules environ) (tableau VII).

Tableau VII

Libération de bactériophages par une souche lysogène lavée avec ou sans adjonction de phages extérieurs

Temps	Nombre de taches vierges	
	avec phage ext.	sans phage
0'	42	0
20'	35	0
60'	33	0
120'	46	0
18 heures	env. 300	env. 300

(Nombre de particules de phages ajouté = 40)

Ces différentes expériences nous prouvent donc bien, que nous sommes en présence de souches lysogènes. Les mutants lysogènes appartiennent aussi bien au groupe X-positif qu'au groupe X-négatif.

Les souches lysogènes chauffées pendant 3' à 100° n'adsorbent pas le phage; ceci nous permet de supposer que les souches lysogènes sont privées du récepteur spécifique, ou bien, que le récepteur est bloqué.

Discussion

On sait que les récepteurs spécifiques des phages, situés à la surface des bactéries, sont en relation étroite avec les antigènes ¹⁹. On sait également qu'entre l'adsorption du phage et la lyse bactérienne, une série de facteurs entrent en jeu. *Wahl* et *Josse-Goichot* ^{20, 21}, entre autres, ont décrit des mutants résistants conservant la propriété d'adsorber le phage, mais ayant perdu l'«enzyme-clé» de la synthèse du virus.

Si dans le cas de *Proteus* 0X 19 nous exprimons ces données par des symboles, R représentant le récepteur spécifique, E l'«enzyme-clé» de la synthèse, et X l'antigène X du *Proteus*, on peut dresser le tableau hypothétique suivant sur la constitution des mutants de 0X 19 (tableau VIII).

Tableau VIII

Schéma hypothétique des mutants d'une souche X sensible

	X	R	E	Mutants correspondants
	+	+	+	Souche originale
1.	+	+	—	KP 21 et mutants X-pos. adsorbant le phage
2.	+	—	—	Mutants X-pos. non-ads.
3.	+	—	+	Mutants X-pos. non-ads.
4.	—	+	—	Mutants X-neg. ads.
5.	—	—	—	Mutants X-neg. non-ads.
6.	—	—	+	Mutants X-neg. non-ads.
7.	—	+	+	Souche X-neg, sensible (?)

Voyons jusqu'à quel point ces cas théoriques ont été trouvés réalisés. $X + R + E +$ représente naturellement les souches originales sensibles.

$X + R + E -$ représente les souches X ayant perdu la faculté de synthétiser le phage, mais pouvant encore l'adsorber; c'est précisément le cas de KP 21 et des mutants X-positifs adsorbants.

Les deux possibilités suivantes, $X + R - E -$ et $X + R - E +$, que l'on ne peut pas distinguer par nos méthodes, sont les mutants X-positifs n'adsorbant pas le phage.

Le quatrième cas, $X - R + E -$, est celui des mutants X-négatifs adsorbant le phage.

Les cas 5 et 6, homologues des cas 2 et 3, sont des mutants X-négatifs n'adsorbant pas le phage.

Le cas 7, $X - R + E +$, représenterait une souche X-négative sensible au phage. Rappelons que parmi 134 souches de *Proteus vulgaris*, nous n'avons pas trouvé de souches sensibles. Ne possédant pas de méthode puissante pour l'isolement de ce genre de mutants, nous ne pouvons nous prononcer sur son existence éventuelle.

Les cas 3 et 6 offrent un intérêt théorique, puisqu'ils contiennent la chaîne de synthèse du phage, tout en ayant perdu le récepteur. C'est dans ce groupe qu'on serait tenté d'introduire les souches lysogènes.

En conclusion, il semble possible par l'examen de la sensibilité au bactériophage d'approfondir la classification sérologique, puisque, comme nous l'avons démontré, le récepteur du phage n'est identique ni à l'antigène X, ni aux antigènes O et H du schéma de *Kauffmann* et *Perch*. La souche originale KP 21 peut être considérée comme un mutant de OX 19.

Résumé

1. Sur 134 souches de *Proteus* isolées à Zurich, on n'a trouvé aucune souche X.
2. 9 souches que nous devons à l'obligeance du professeur Kauffmann, ainsi qu'une souche de l'Institut de Zurich, faisant toutes partie du groupe OX 19, ont été étudiées dans leur comportement vis-à-vis d'un bactériophage anti-OX 19.
3. La souche KP 21, sérologiquement identique à OX 19, se distingue des autres souches par sa résistance au bactériophage.
4. Parmi les nombreux mutants résistants au bactériophage, un pourcentage élevé avait conservé l'antigène X. Indépendamment de cette propriété, certains mutants résistants avaient conservé la faculté d'adsorber le phage.
5. La lysogénie de certains mutants a été étudiée.

Je tiens à exprimer ici ma gratitude au Professeur H. Mooser, qui a bien voulu assumer la direction de ce travail et y porter un constant intérêt.

Bibliographie

- ¹ Weil E. et Felix A.: Wien. Klin. Wschr. 29. 33. 947. 1916.
 - ² Rocha Lima H. da: Berl. Klin. Wschr. 53. 567. 1916.
 - ³ Fejgin B.: C. R. Soc. Biol. 73. 40. 1936.
 - ⁴ Castaneda R. et Zia S.: J. exp. Med. 58. 55. 1933.
 - ⁵ Castaneda R.: J. exp. Med. 60. 119. 1934.
 - ⁶ Castaneda R.: J. exp. Med. 62. 289. 1935.
 - ⁷ Hammarström R., Fahraeus J., Helistein H.: Int. Hyg. Publ. 38. 264. 1946.
 - ⁸ Giroud P. et Jude A.: C. R. Soc. Biol. 141. 721. 1947.
 - ⁹ Krestovnikova V.: J. J. Microb. (russe) 4. 17. 1947.
 - ¹⁰ Westphal O., von Gontard D., Bister F. et Winkler A.: Zeitschr. Natur. 2b. 25. 1947.
 - ¹¹ Ciuca M., Mesrobeanu L., Badenski A. et Munteanu G.: C. R. Soc. Biol. 127. 1414. 1938.
 - ¹² Ciuca M., Mesrobeanu L.: Bull. Acad. Med. Roum. (Sect. Scient.) 23. 310. 1947.
 - ¹³ Kauffmann F. et Perch B.: Act. Path. Micr. Scand. 24. 135. 1947.
 - ¹⁴ Perch B.: Act. Path. Micr. Scand. 25. 703. 1948.
 - ¹⁵ Craigie J. et Yen C. H.: Can. Publ. Health. J. 29. 448. 1938.
 - ¹⁶ Snedecor G. W.: Statistical Methods. Jowa State College Press. 4th Ed. 1946.
 - ¹⁷ Marti H.: Dissertation Zurich 1950.
 - ¹⁸ Gratia A.: Ann. Inst. Past. 56. 307. 1936.
 - ¹⁹ Wahl R. et Fouage J.: Ann. Inst. Past. 82. 542. 1952.
 - ²⁰ Wahl R. et Josse-Goichot J.: C. R. Ac. Sci. 230. 1225. 1950.
 - ²¹ Wahl R. et Josse-Goichot J.: C. R. Ac. Sci. 230. 1103. 1950.
-

Curriculum vitae

Je suis née le 15 juin 1925 à Thessalonique (Grèce). Après avoir fait mes études primaires et secondaires dans cette ville, j'ai obtenu le diplôme de maturité en 1942. J'ai poursuivi à l'Université de Thessalonique mes études de médecine, que j'ai terminées en 1950. En 1950/51, j'ai été assistante à la 2^{me} Clinique médicale universitaire de Thessalonique. Par la suite, jusqu'en 1952, j'ai effectué un stage à l'Institut d'Hygiène de l'Université de Lausanne. En 1952/53, je me suis consacrée à mon travail de doctorat dans les laboratoires du Professeur H. Mooser, à l'Institut d'Hygiène de l'Université de Zurich.
